

任改婷,张桂芳,张黎. 不同品种长寿花试管苗再生体系的建立[J]. 江苏农业科学,2017,45(9):27-30.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.007

不同品种长寿花试管苗再生体系的建立

任改婷,张桂芳,张黎

(宁夏大学农学院,宁夏银川 750021)

摘要:以5个品种长寿花的叶片和茎段为试验材料,开展长寿花试管苗繁育研究,探讨光照强度及不同植物激素组合对愈伤诱导率、丛芽诱导率、增殖系数等方面的影响。结果发现,不同品种之间存在差异,月桂、节日、霍恩愈伤诱导最佳培养基为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA;西伦的为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA;紫缤的为MS+1.5 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA。月桂、西伦丛芽诱导最佳培养基为MS+2.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA,节日的为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L NAA,紫缤、霍恩的为MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA。月桂增殖最佳培养基为MS+0.2 mg/L 6-BA+0.2 mg/L ZT+0.3 mg/L NAA,节日为MS+0.4 mg/L ZT+0.3 mg/L NAA,西伦、霍恩的为MS+0.4 mg/L 6-BA+0.4 mg/L ZT+0.2 mg/L NAA,紫缤的为MS+0.4 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA。花泥作为载体进行瓶外生根,生根率达90%以上,最佳光照度为2 500 lx。

关键词:长寿花;试管苗;品种差异;再生体系

中图分类号: S682.390.4⁺3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)09-0027-03

长寿花(*Kalanchoe blossfeldiana*)是景天科伽蓝菜属肉质草本花卉,原产马达加斯加,别称矮生伽蓝菜、寿星花、假川莲,因其花叶可观,花期长、耐干旱、栽培容易、装饰效果好,是国际花卉市场中发展最快的盆花之一^[1-2]。随着品种不断推陈出新,市场品种越来越多。目前,国内有关长寿花组织培养差异性研究较少和缺乏系统的研究,且不同研究者的结果差异较大^[3]。本试验以5个品种长寿花为材料,比较其试管苗愈伤诱导、丛芽诱导、丛芽增殖、生根差异,研究品种差异性及影响长寿花试管苗玻璃化、徒长的主要因子,为提高试管苗成活率提供科学依据,并为研究不同品种长寿花试管苗再生体系的建立奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 材料

试验材料取自宁夏园艺产业园园艺馆,为长寿花月桂(Loren)、节日(Fiesta)、西伦(Theron)、紫缤(Leonardo)、霍恩(Hawn)品种的叶片和茎段。

1.2 试验方法

1.2.1 不同品种长寿花启动培养基筛选 启动培养基成分:MS+不同浓度6-BA和NAA(表1),附加30 g/L蔗糖、6 g/L琼脂,pH值为5.8。试验材料用洗洁精清洗3 min,流水冲洗15 min后,置于超净工作台上,将叶片用0.1% HgCl₂灭菌8 min,茎段灭菌10 min,再用无菌水冲洗3遍。外植体经过灭菌处理后,将叶片切成1.5 cm×1.5 cm大小,茎段切

成1.5~2.0 cm小段,接种于初代培养基中,培养温度为(24±2)℃。每瓶接种3个外植体,每个处理10瓶,试验重复3次,30 d后统计愈伤诱导率和丛芽诱导率。

表1 初代诱导试验设计

处理	6-BA 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)
A1	1.0	0.1
A2	1.0	0.2
A3	1.5	0.1
A4	1.5	0.2
A5	2.0	0.1
A6	2.0	0.2

1.2.2 不同品种长寿花继代培养基筛选 试验采取L₉(3⁴)正交设计,选择6-BA、ZT、NAA等3种激素,共9个处理(表2)。切取初代培养的无菌苗接种到不同激素配比的增殖培养基,每处理接种10瓶,重复3次,培养30 d后统计增殖后的总芽数,计算增殖系数、玻璃化率。

表2 继代正交试验设计表 L₉(3⁴)

处理	6-BA 浓度 (mg/L)	ZT 浓度 (mg/L)	NAA 浓度 (mg/L)
E1	1(0)	1(0)	1(0.1)
E2	1	2(0.2)	2(0.2)
E3	1	3(0.4)	3(0.3)
E4	2(0.2)	1	2
E5	2	2	3
E6	2	3	1
E7	3(0.4)	1	3
E8	3	2	1
E9	3	3	2

1.2.3 光照度对长寿花生长的影响 将5个品种初代培养的无菌苗转接于对应的继代增殖最佳培养基上,设光照度分

收稿日期:2016-03-01

基金项目:宁夏科技支撑计划(编号:2014ZZN09)。

作者简介:任改婷(1992—),女,河南洛阳人,硕士研究生,从事园林植物与观赏园艺研究。E-mail:861769144@qq.com。

通信作者:张黎,宁夏银川人,教授,硕士生导师,从事园林植物与观赏园艺研究。E-mail:zhang_li9988@163.com。

别为 1 500、2 000、2 500 lx,培养 60 d 后统计节数、节间长度。

1.2.4 长寿花瓶外生根 选取继代培养中生长健壮、高(4.5 ± 0.3) cm、具 2 对叶的无菌苗,作为瓶外生根的植株,炼苗后插入填有花泥(用牙签戳洞)和草炭,并添加不同浓度 NAA 处理的穴盘内,每穴 1 株,插入深度为 1.5 ~ 2 cm,30 d 后,统计生根率。

1.3 数据统计及分析

采用 DPS 软件对数据进行处理,采用 Duncan's 新复极差法进行多重比较。

愈伤诱导率 = 出现愈伤的外植体数/未污染的外植体数 × 100%; 丛芽诱导率 = 萌生丛芽的外植体数/未污染的外植体数 × 100%; 增值系数 = 增殖后的总芽数/接种的芽数; 玻璃化率 = 玻璃化的总苗数/接种的总苗数 × 100%; 生根率 = 生根株数/培养株数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同品种长寿花初次培养

2.1.1 不同品种长寿花叶片愈伤诱导差异性比较 研究发

现,不同处理间长寿花叶片愈伤诱导率存在差异,其中 A1 为月桂、节日、霍恩 3 个品种最佳愈伤诱导培养基,该处理中的愈伤诱导率显著高于其他 5 个处理。西伦的愈伤诱导率在 A1 和 A6 间无显著差异,但两者与 A2、A3、A4、A5 差异极显著;由于 A6 愈伤生长状况优于 A1,因此 A6 为西伦愈伤诱导最佳培养基。紫缤的愈伤诱导率在 A2 和 A4 间无显著差异,两者与 A1、A3、A5、A6 之间差异极显著;由于 A4 愈伤生长状况优于 A2,因此 A4 为紫缤愈伤诱导最佳培养基(表 3、表 4)。

表 3 不同品种长寿花叶片愈伤诱导率比较

处理	愈伤诱导率(%)				
	月桂	节日	西伦	紫缤	霍恩
A1	85.01A	82.44A	67.25A	74.91B	38.02A
A2	82.60B	49.32D	62.83B	78.14A	27.51C
A3	63.12E	26.31F	32.01D	75.32B	20.15D
A4	72.81D	33.44E	35.55C	78.32A	32.20B
A5	75.93C	70.52C	63.02B	59.16C	21.71D
A6	81.98B	77.71B	68.41A	61.13C	22.57D

注:数据后不同大写字母表示差异极显著(P < 0.01),不同小写字母表示差异显著(P < 0.05)。下表同。

表 4 不同品种长寿花愈伤生长情况比较

处理	愈伤生长情况				
	月桂	节日	西伦	紫缤	霍恩
A1	绿色+++	绿色++	绿色,透明+	绿色,透明++	褐色+
A2	绿色++	绿色++	绿色,透明+	白色,海绵状+	褐色+
A3	绿色+	绿色+	绿色,泛白+	淡绿色+	白色+
A4	淡绿色+	绿色+	绿色,泛白+	绿色++	白色+
A5	绿色++	绿色++	白色转绿++	白色,海绵状+	黑色+
A6	绿色,透明+	绿色++	淡绿色,小颗粒状+++	淡绿色++	淡绿色+

注:“+”表示差,“++”表示一般,“+++”表示较好。

2.2.2 不同品种长寿花茎段丛芽诱导差异性比较 研究发现,A6 为月桂最佳丛芽诱导培养基,在该培养基中月桂茎段丛芽诱导率极显著高于 A1、A2、A3、A4、A5 处理。A2 为节日最佳丛芽诱导培养基,在该培养基中节日茎段丛芽诱导率与 A1、A3、A4、A5、A6 之间差异极显著。A6 为西伦最佳丛芽诱导培养基,在该培养基中茎段丛芽诱导率与 A1、A2、A3、A4、A5 之间差异极显著。紫缤芽诱导率在 A1 和 A2 之间无显著差异,但两者与 A3、A4、A5、A6 差异极显著;由于在 A1 培养基中丛芽生长状况优于 A2 培养基,因此 A1 为最佳丛芽诱导培养基。A1 为霍恩最佳丛芽诱导培养基,在该培养基中其茎

段丛芽诱导率与 A1、A2、A3、A4、A5 之间差异极显著(表 5、表 6)。

表 5 不同品种长寿花茎段丛芽诱导率比较

处理	丛芽诱导率(%)				
	月桂	节日	西伦	紫缤	霍恩
A1	68.70C	76.81B	60.81F	66.96A	20.30A
A2	63.51D	80.50A	70.41C	67.41A	0D
A3	71.23B	55.23C	68.37D	53.97B	0D
A4	68.33C	55.92C	63.11E	54.52B	0D
A5	54.70E	48.91E	73.45B	24.30C	17.51C
A6	78.82A	52.04D	85.33A	19.81D	18.44B

表 6 不同品种长寿花丛芽生长情况

处理	愈伤生长情况				
	月桂	节日	西伦	紫缤	霍恩
A1	丛芽数量少,芽苗微黄	丛芽数量少,芽苗壮	丛芽适中,芽苗壮	丛芽数量多,芽苗壮	丛芽数量少,芽苗黄
A2	丛芽数量少,芽苗壮	丛芽数量适中,芽苗壮	丛芽适中,芽苗壮	丛芽数量多,芽苗黄	
A3	丛芽适中,芽苗健壮	丛芽数量多,长势好	丛芽多,芽苗长势好	丛芽多,芽苗长势好	
A4	丛芽适中,芽苗健壮	丛芽多,芽苗弱	丛芽多,芽苗细弱	丛芽多,芽苗长势好	
A5	丛芽适中,芽苗微黄	丛芽多,长势好	丛芽多,芽苗健壮	丛芽少,芽苗长势弱	丛芽数量多,芽苗细弱
A6	丛芽多,芽苗浓绿	丛芽多,芽苗细弱	丛芽多,芽苗健壮	丛芽少,芽苗长势弱	丛芽数量多,芽苗细弱

2.2 不同品种长寿花继代增殖培养

2.2.1 不同激素水平对继代增殖的影响 月桂、西伦、霍恩在 E9 中与其余 8 个处理差异显著,E9 增殖效果好。E3、E6、E7、E8、E9 之间节日增殖系数差异不显著,但与 E1、E2、E4 差

异显著,E3、E6、E7、E8、E9 增殖效果好。紫缤在 E6、E7、E8、E9 之间差异不显著,但与其 E1、E2、E3、E4、E5 差异显著,E6、E7、E8、E9 增殖效果好(表 7)。

2.2.2 不同激素水平对长寿花继代增殖玻璃化的影响 研

表7 不同长寿花品种继代增殖系数比较

处理	丛芽增殖系数(倍)				
	月桂	节日	西伦	紫缤	霍恩
E1	2.61F	2.01D	1.15D	1.35C	1.27C
E2	2.11G	1.70D	1.33BC	1.28C	1.25C
E3	8.73D	10.36AB	1.50B	3.28B	1.30C
E4	2.74F	3.05C	1.46BC	3.46B	1.40C
E5	8.62DE	10.21B	1.42BC	3.20B	1.29C
E6	10.33B	10.68AB	2.07B	5.10A	2.13B
E7	8.27E	10.47AB	1.35BC	4.75A	1.50C
E8	9.85C	10.45AB	1.92BC	4.62A	1.98B
E9	11.23A	10.96A	2.14A	5.35A	2.66A

究发现,各因素对长寿花玻璃化影响程度是6-BA > ZT > NAA。月桂在E1、E2、E3、E4、E5之间无差异,均无玻璃化,但其与E6、E7、E8、E9差异显著;综合考虑增殖系数、玻璃化率,E5在无玻璃化情况的处理中为最佳继代增殖培养基。节日在E1、E2、E3、E4之间无差异,其与其他5组处理差异显著;结合增殖系数分析结果,E3在无玻璃化情况的处理中为最佳继代增殖培养基。紫缤在E1、E2、E3、E4、E5、E7之间无差异,其与E6、E8、E9差异显著;结合增殖系数分析结果,E7在无玻璃化情况的处理中为最佳继代增殖培养基。西伦、霍恩无玻璃化,E9仍为最佳继代增殖培养基(表8)。

2.2.3 光照度对试管苗生长的影响 继代中,不同品种出现了不同程度的徒长现象,通过改变光照度控制试管苗徒长,获得良好株型。研究发现,5个品种在不同光照度处理下生长差异显著。随着光照度的递增,节数变化没有表现一致的规

表9 不同光照度对长寿花继代生长的影响

光照度 (lx)	节数(个)					节间长(cm)				
	月桂	节日	西伦	紫缤	霍恩	月桂	节日	西伦	紫缤	霍恩
1 500(C1)	3.81a	3.93a	3.70b	3.69c	4.62a	14.65a	15.76a	15.50a	14.85a	9.34a
2 000(C2)	3.73b	3.95a	3.84a	3.91a	4.41b	11.40b	10.94b	11.13b	10.74b	7.86b
2 500(C3)	3.82a	3.60b	3.72b	3.80b	4.43b	9.31c	9.90c	9.72c	9.40c	6.93c

2.3 长寿花瓶外生根

研究发现,4、5、6组处理的生根率与1、2、3组处理有极显著差异。长寿花组试管苗瓶外生根,花泥作为载体适宜,生根率达到90%以上,与瓶内生根差别不大(表10)。由于瓶外生根可省去组培苗生根这一环节,避免了炼苗困难问题,因此可缩短生产周期、节约成本。

表10 长寿花瓶外生根

序号	处理	NAA浓度(mg/L)	生根率(%)
1	草炭	0	82.75B
2	草炭	0.5	81.67B
3	草炭	1.0	84.32B
4	花泥	0	90.58A
5	花泥	0.5	92.80A
6	花泥	1.0	92.92A

注:表中统计生根率为5个品种平均值。

3 结论与讨论

本试验对5个品种的长寿花组培再生系统进行了研究,建立了其稳定高效的组织快繁体系,筛选出了5个品种的最

表8 长寿花玻璃化率正交结果分析

处理	激素			玻璃化率(%)		
	6-BA (mg/L)	ZT (mg/L)	NAA (mg/L)	月桂	节日	紫缤
E1	0	0	0.1	0dD	0fF	0C
E2	0	0.2	0.2	0dD	0fF	0C
E3	0	0.4	0.3	0dD	0fF	0C
E4	0.2	0	0.2	0dD	0fF	0C
E5	0.2	0.2	0.3	0dD	8.70eE	0C
E6	0.2	0.4	0.1	51.31cC	44.80cC	3.25B
E7	0.4	0	0.3	0dD	11.03dD	0C
E8	0.4	0.2	0.1	54.43bB	53.57bB	3.47B
E9	0.4	0.4	0.2	73.28aA	68.79aA	7.51A
k_1 (月桂)	0.00	0.00	35.25			
k_2 (月桂)	17.10	18.14	24.43			
k_3 (月桂)	42.57	41.53	0.00			
R (月桂)	42.57	41.53	35.25			
k_1 (节日)	0.00	3.68	32.8			
k_2 (节日)	17.83	20.76	22.93			
k_3 (节日)	44.46	37.86	6.58			
R (节日)	44.46	34.18	26.22			
k_1 (紫缤)	0.00	0.00	2.24			
k_2 (紫缤)	1.08	1.16	2.50			
k_3 (紫缤)	3.66	3.59	0.00			
R (紫缤)	3.66	3.59	2.50			

注:西伦、霍恩无玻璃化现象。

律。C3节间长和C1、C2有显著差异,5个品种表现一致,光照越强,节间越短,最适宜光照度均为C3(2 500 lx)(表9)。

佳诱导培养基,增殖培养基,并分析了组织培养中影响玻璃化的因素,发现长寿花玻璃化因素为6-BA > ZT > NAA,其中6-BA为主要因子。月桂玻璃化率高达73.28%,节日为68.79%,紫缤为7.51%。通过对光照控制,减缓了长寿花组培苗徒长,发现长寿花继代增殖培养的最适宜光照度为2 500 lx。此外,比较了长寿花瓶外生根的方法,并筛选出花泥为较适宜瓶外生根载体,生根率达90%。

试验结果表明,不同品种愈伤组织诱导最佳外植体均为叶片,但最佳诱导培养基不同。以茎段为外植体直接进行丛芽诱导,其最佳诱导培养基也不同,这可能与品种间的遗传差异性有关。在一定浓度范围内,6-BA浓度越大,增殖系数越大,但6-BA、ZT在继代增殖过程对玻璃化率影响显著,说明长寿花对6-BA、ZT比较敏感。这与林玉玲等研究结果^[4]一致,当6-BA超过一定浓度时,植株分裂快,导致营养和水分都不足,植物茎秆细,叶片小,茎叶比例不协调。试验结果还表明长寿花试管苗节间长、徒长与光照度有关,对高效工厂化育苗有一定的指导作用,但徒长与光质、光照时间、温度、水分的关系还需要在以后的试验中进一步探索。

长寿花组培过程中极易生根^[5-7],在增殖培养过程中有

田凡,颜凤霞,姜运力,等.带叶兜兰种子无菌萌发及试管成苗技术研究[J].江苏农业科学,2017,45(9):30-33.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.008

带叶兜兰种子无菌萌发及试管成苗技术研究

田凡,颜凤霞,姜运力,王莲辉
(贵州省林业科学研究院,贵州贵阳 550005)

摘要:为初步建立带叶兜兰组织培养快速繁殖体系,对带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)成熟种子进行无菌萌发、原球茎分化及根诱导研究。结果表明:有机添加物香蕉对原球茎的诱导与分化有较好的促进作用;培养基配比为:1/2 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L+2.0%葡萄糖+0.5%琼脂+0.05%活性炭,对原球茎的诱导和增殖有明显的促进作用;不同浓度配比的6-BA和NAA对芽增殖影响不明显,但低浓度的NAA对芽的分化影响显著;1/2 MS+IBA 0.2 mg/L对带叶兜兰的根诱导效果最为理想;碎树皮为栽培基质的移栽成活率达96%。

关键词:带叶兜兰;无菌萌发;快繁;试管成苗;培养基

中图分类号:S682.310.4⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)09-0030-04

兜兰属(*Paphiopedilum*)隶属于兰科(Orchidaceae)植物,主要分布于我国贵州、广西和云南^[1]。兜兰具有很高的观赏价值,十分珍贵,野生资源遭到过度采掘,已经到了濒临灭绝的边缘,被列入《野生动植物濒危物种国际贸易公约》的保护对象^[2]。兜兰种子没有胚乳,在自然环境中须与真菌共生才能萌发,且萌发率极低^[3]。而兜兰的克隆增殖是世界性难题,即使能诱导出愈伤组织或幼芽,增殖率仍很低^[4]。目前,利用种子非共生无菌萌发成苗是兜兰植物规模化快繁的唯一途径,是解决其保育问题的重要手段。

带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)是兜兰属地生或半附生草本植物,是兰科中最原始的类群之一,株形娟秀,花朵造型独特,花期持久,被誉为兜兰中的“美娇娘”^[5]。目前,关于兜兰属其他植物的种质保护与无菌苗快繁技术已有很多报道^[6-10],但与带叶兜兰相关的研究鲜有报道^[11-12]。研究了带叶兜兰种子无菌播种与试管快速成苗体系,探讨带叶兜兰组培快繁技术,以期带叶兜兰人工快繁的规模化和产业

化提供科学依据和技术支持,为最终实现带叶兜兰种质资源的保育及可持续开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

带叶兜兰(*Paphiopedilum hirsutissimum*)植株为贵州省林业科学研究院种质资源。5月盛花期进行人工同种异株授粉(图1);当年9月左右,种子干燥接近成熟,从授粉到蒴果成熟开裂需要120 d左右(图2)。

1.2 试验方法

1.2.1 种子预处理 先将带叶兜兰种子荚流水冲洗5 h后移入超净工作台,用75%乙醇浸泡10 min,0.1%次氯酸钠浸泡15 min,后用无菌水冲洗3~5次。用无菌滤纸吸干多余水分,切开种皮,将种子撒落在所配制的各种固体琼脂培养基上。

1.2.2 培养基 以1/2 MS为基本培养基。培养基中加葡萄糖30 g/L(生根为20 g/L)和琼脂6 g/L作为固定剂,加热完全融化后调至pH值5.2~5.4,分别装40 mL到培养瓶中,用瓶盖封口,每一个处理接种15~20瓶,放在蒸汽高压锅(120℃,20 min)内灭菌,室温冷却后待用。

1.2.2.1 不同有机添加物对原球茎诱导与分化的影响 将种子分别接种到5种培养基:(M1)1/2MS+10%马铃薯+2.0%葡萄糖+0.4%琼脂+0.1%活性炭;(M2)1/2MS+10%椰乳+2.0%葡萄糖+0.4%琼脂+0.05%活性炭;(M3)

收稿日期:2016-01-30

基金项目:贵州省科技厅农业攻关项目(编号:黔科合NY字[2010]3029号);贵州省林业厅青年人才基金(编号:黔林科合J[2013]2号)。

作者简介:田凡(1985—),女,贵州铜仁人,硕士,助理研究员,主要从事兰科植物保育研究。E-mail:tianfan850507@126.com。

通信作者:王莲辉,研究员,主要从事兰科植物保育及快繁技术研究。E-mail:gzwanglianhui@163.com。

根生成,在不添加任何激素的MS培养基中能较好生根;直接用花泥进行瓶外生根,生根率达到90%以上。生产上,可以采用此法,降低生产成本,缩短育苗时间。

参考文献:

- [1]史建林,曹骏.长寿花栽培养护技术[J].上海农业科技,2012(2):94-94.
- [2]贺爱利,黄海帆.长寿花组织培养研究进展[J].河南农业,2012(14):44-45.

- [3]颜俊.长寿花品种选择与盆花生产[J].中国花卉园艺,2005(16):12-15.
- [4]林玉玲,赖钟雄,林菁,等.4个品种长寿花试管苗的增殖与生根培养[J].热带作物学报,2007,28(2):80-86.
- [5]孙利娜.长寿花嫩叶片的组织培养研究[J].西部林业科学,2011,40(2):48-51.
- [6]孙新政,李庆伟,梁明勤.白花长寿花组培快繁技术研究[J].中国农学通报,2006,22(3):39-42.
- [7]刘红美,夏开德,方小波,等.长寿花高繁殖组培体系及瓶外生根技术[J].安徽农业科学,2010,38(12):6112-6115.